第 42 卷 第 4 期
1999 年 11 月

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

Vol.42，No.4
Nov.，1999

棉铃虫 4 龄幼虫的摄食行为和中肠蛋白酶活性的变化*

李 伟　　王琛柱**
（中国科学院动物研究所，农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室，北京 100080）

摘要 通过测定棉铃虫 4 龄幼虫，每隔 12 h 的摄食量、体重净增量以及丝氨酸蛋白酶活性的变化，揭示了它的取食行为及中肠蛋白酶活性的变化规律。结果表明：棉铃虫 4 龄幼虫取食及消化呈有规律的变化，蜕皮后 4 龄初，摄食量、体重净增量、类胰蛋白酶、类胰凝乳蛋白酶和总蛋白酶活性均逐渐增加；进入中期（36～48 h），各项指标达到最高值；其后，随着摄食量的下降，各项指标逐渐下降。同时，连续观察幼虫取食高峰期的取食行为 6 h，结果表明：其间一次连续取食的平均时间为（3.6±0.4）min/次，总平均取食时间为（62.4±8.9）min，约占整个时间的 1/6。该文还对棉铃虫 4 龄幼虫不同时段取食行为与蛋白酶活性变化之间的相关性及调控机制作了初步讨论。

关键词 棉铃虫，摄食行为，蛋白酶

昆虫在同一龄期内取食行为有明显变化，这与蜕皮前后其消化系统形态及生理方面周期性的变化有关[1]。Simpson 等对蝗虫 *Locusta migratoria* 取食前后中肠形态及组织学方面的变化进行了研究，揭示出短时间内取食对消化系统有诱导效应[2,3]；Bernays 和 Chapman 等则指出了可能的调控机制[4,5]。但是，上述工作多以蝗虫为材料，研究侧重在取食对消化系统的短期诱导效应。

棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（Hübner）是我国重要的农作物害虫，属全变态昆虫，其消化系统在结构及生理方面与渐变态的直翅目昆虫有较大差异。了解棉铃虫幼虫同一龄期内取食行为及蛋白酶活性的变化规律，是进一步开展棉铃虫消化生理方面的研究工作的基础。作者研究了棉铃虫幼虫在第 4 龄期中取食行为及中肠蛋白酶活性的变化，结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 试虫：棉铃虫为室内人工饲养多代的标准试虫。养虫和试验条件为温度 27℃、相对湿度 75%、光照时间 14 h。成虫饲以 10% 的蜂蜜水溶液。卵产于纱布上。幼虫饲于直径 2 cm、长 10 cm 的平底指形管内，每管一头。依蜕皮时间，严格选择发育均一的幼虫供试验

* 国家自然科学基金项目（39670492）和中国科学院重点项目（6-152111-04）
** 通讯作者
1998-03-02 收稿，1998-11-23 收修改稿

用。幼虫饲料配方主要参照 Bot 的配方配制[6]，原麦胚粉和酪蛋白分别由麦芽粉和奶粉代替。

1.1.2 试剂：氨苯磺胺偶氮酪蛋白、α-N-苯甲酰-DL-精氨酸-p-硝基苯胺（BAPNA）、p-甲苯磺酰-L-精氨酸甲酯（TAME）、N-苯甲酰-L-酪氨酸乙酯（BTEE）均购自美国 Sigma 公司。其它试剂均为国产分析纯。

1.2 不同时段幼虫取食量和体重净增量的变化

刚蜕皮进入 4 龄的棉铃虫幼虫共 10 头在上述条件下用豌豆（*Pisum sativum* L.）的嫩粒饲养，饲前称量饲料重量和幼虫体重。从进入 4 龄开始，每隔 12 h 称量饲后饲料及幼虫体重，同时更换并称量新的饲料。估算饲料在实验条件下 12 h 的水分丧失量，以校正取食量。实验过程中确保饲料充足。

1.3 不同时段幼虫中肠蛋白酶活性的变化

刚蜕皮进入 4 龄的幼虫以嫩豌豆粒饲养，方法同上。从蜕皮结束刚进入 4 龄开始（刚进入 4 龄的幼虫为第一组），每隔 12 h 取出一组，每组 3 头幼虫，共取 6 组，取出后即刻冻于 －20℃冰箱中，待解剖。实验设 3 次重复。

4 龄幼虫在 0～4℃下迅速解剖，用预冷的 0.15 mol/L 的 NaCl 溶液冲去体液，截取中肠及其内容物，以 0.15 mol/L 的 NaCl 溶液在冰浴状态下匀浆。匀浆液用 Beckman-11 离心机在 11 200×g、4℃条件下离心 15 min，取上清液作为测试用的中肠酶液。

根据王琛柱等[7]，蛋白酶活性在 30℃、最适 pH 值下，使用 Beckman UV Series 600 型紫外-可见分光光度计测定。总蛋白酶活力用 pH 10.50 的甘氨酸缓冲液，以氨苯磺胺偶氮酪蛋白为底物测定。反应混合物在 11200×g、4℃下离心 15 min 后，取上清液，测量 366 nm 下的光吸收值。反应混合物 1 个吸收单位的变化定义为 1 个偶氮酪蛋白单位。类胰蛋白酶活力以 BAPNA 和 TAME 两种专性底物测定，分别用 pH 10.5 的甘氨酸缓冲液和 pH 8.50 的 Tris 缓冲液，测量 405 nm 下反应混合物的光吸收值和 247 nm 下反应混合物的光吸收变化值。类胰凝乳蛋白酶活力用 pH 8.50 的 Tris 缓冲液，以 BTEE 为专性反应底物，测定 256 nm 下光吸收的变化值。

蛋白质含量以牛血清蛋白为标准蛋白，用 Bradford 的方法[8]测定。

1.4 取食高峰期幼虫取食行为的观察

选取蜕皮后取食 36 h 的棉铃虫幼虫，在散射光下连续观察 6 h，并记录取食情况，为防止幼虫钻蛀造成观察不便，饲前将青豌豆切成薄片。设 3 次重复。几种取食指标定义为：

一次取食过程（meal）：没有间隔的一段连续取食过程；

每次取食时间（meal length）：一次取食过程消耗的时间，用 min/次表示；

总取食时间（overall meal length）：观察时间内取食时间的总和，用 min 表示。

2 结果分析

2.1 不同时段幼虫取食量和体重净增量以及中肠蛋白酶活性的比较

从图 1 看出，蜕皮后的 24 h 内，幼虫取食量较低，随后的 12 h 内取食量迅速增加，达到

最高值，其后取食量减少，在蜕皮后的 48～60 h 停止取食。从图 2 看出，蜕皮后的 12 h 内，幼虫体重净增量较低，随后的 36 h 内体重净增量迅速增加，并保持在最高状态，在蜕皮后的 48～60 h 体重下降。

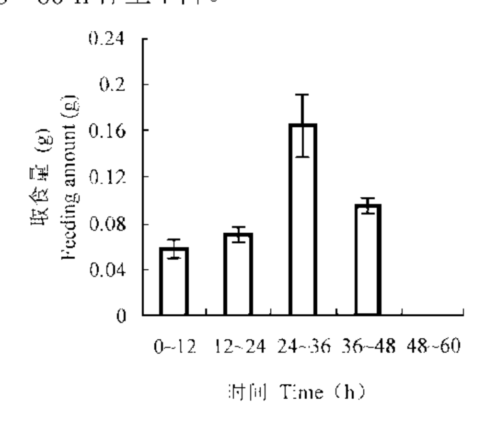


图 1　棉铃虫 4 龄幼虫在不同时段取食量的变化

柱图上的范围标记表示平均数的标准误差，下同

Fig.1　Change of feeding amount of *H. armigera* larvae in the 4th instar

The range in each bar represents ± standand error of mean, it is same in the following figures

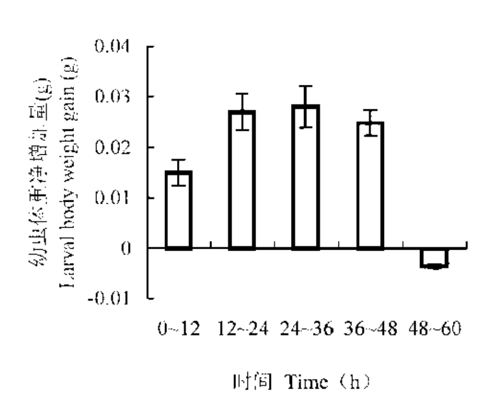


图 2　棉铃虫 4 龄幼虫在不同时段体重净增量的变化

Fig.2　Change of body weight gain of *H. armigera* larvae in the 4th instar

总蛋白酶活力从 4 龄初开始，随幼虫的发育、取食量的增加而增加，进入 48 h 后，达到最高值。之后，随取食量的减少，总蛋白酶活力降低（图 3）。

以 TAME 为底物测得的类胰蛋白酶活力与总蛋白酶活力的变化相似，也随幼虫的发育、取食量的增加而增加，进入 4 龄 36 h 后，其活力就达到最高值，之后，随取食量的减少，活力降低（图 4）。类胰蛋白酶活力用 BAPNA 测定的结果与用 TAME 测定的结果略有不同，其

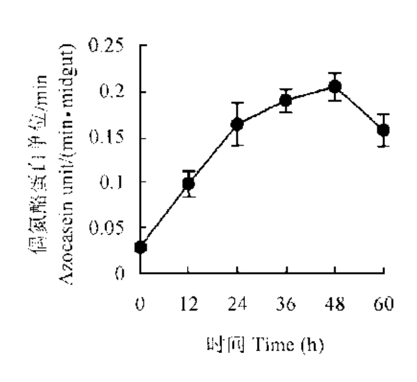


图 3　棉铃虫 4 龄幼虫在不同时段中肠及其内含物内总蛋白酶活力（底物为偶氮酪蛋白）的变化

Fig.3　Change of midgut total protease activity of *H. armigera* larvae in the 4th instar

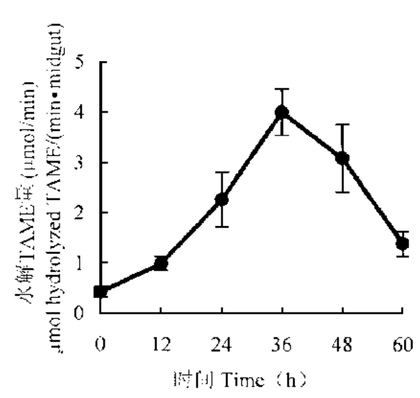


图 4　棉铃虫 4 龄幼虫在不同时段中肠及其内含物内类胰蛋白酶活力（底物为 TAME）的变化

Fig.4　Change of midgut trypsin-like enzyme activity (TAME as substrate) of *H. armigera* larvae in the 4th instar

活性也随幼虫的发育、食量的增加而增加，但这之后，随取食量的减少，活力并不下降，依然保持在一个相当高的活力水平（图 5）。

类胰凝乳蛋白酶活力与总蛋白酶活力及用 TAME 测定的类胰蛋白酶活力的变化相似，也随幼虫的发育、取食量的增加而增加，在进入 4 龄 48 h 后，其活力达到最高值，之后，随取食量的减少，活力降低（图 6）。

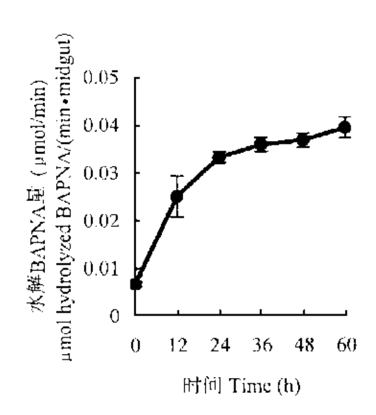


图 5　棉铃虫 4 龄幼虫在不同时段中肠及其内含物内类胰蛋白酶活力（底物为 BAPNA）的变化

Fig.5　Change of midgut trypsin-like enzyme activity (BAPNA as substrate) of *H. armigera* larvae in the 4th instar

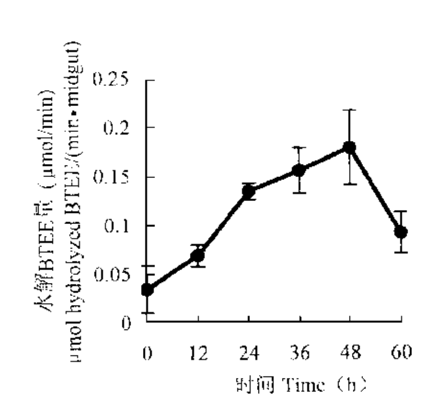
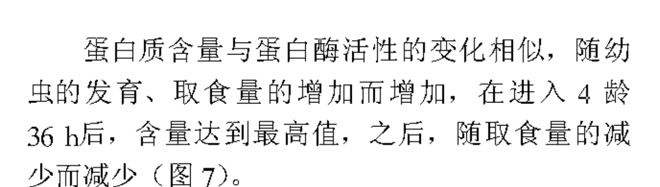


图 6　棉铃虫 4 龄幼虫在不同时段中肠及其内含物内类胰凝乳蛋白酶活力（底物为 BTEE）的变化

Fig.6　Change of midgut chymotrypsin-like enzyme activity (BTEE as substrate) of *H. armigera* larvae in the 4th instar



蛋白质含量与蛋白酶活性的变化相似，随幼虫的发育、取食量的增加而增加，在进入 4 龄 36 h后，含量达到最高值，之后，随取食量的减少而减少（图 7）。

从以上结果看出，中肠蛋白酶活性变化并非完全同步，类胰蛋白酶、类胰凝乳蛋白酶、总蛋白酶的活性分别在进入 4 龄 36 h、48 h 和 48 h 以后达到最高值。

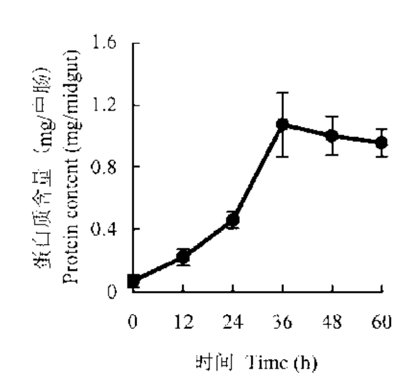


图 7　棉铃虫 4 龄幼虫在不同时段中肠及其内含物内蛋白质含量的变化

Fig.7　Change of midgut protein content of *H. armigera* larvae in the 4th instar

2.2　取食高峰期幼虫取食行为的观察结果

在取食高峰期 6 h 观察过程中，棉铃虫幼虫一次连续取食的平均时间为（3.6 ± 0.4）min/次（最大为 11.1 min/次，最小为 0.1 min/次），总平均取食时间为（62.4 ± 8.9）min（最大为 98.6 min，最小为 33.6 min），约占整个观察时间的 1/6。

3 讨论

从上述结果可以看出，棉铃虫幼虫4龄期内取食及消化呈现有规律的变化，蜕皮进入4龄以后，摄食量，体重净增量，各种蛋白酶活性均逐渐增加；进入4龄中期（36～48 h）以后，各项指标达到最高值；其后，随着摄食量的下降，各项指标逐渐下降（类胰蛋白酶活力用BAPNA测定的结果有所不同）。以上所呈现出的有规律的变化过程，说明这一龄期的棉铃虫幼虫在发育阶段、取食水平和消化水平三者之间存在紧密有序的协调关系。

Bernays、Chapman以及Simpson在对蝗虫 *Locusta migratoria* 取食行为及消化生理研究的基础上，发现蝗虫一般每次取食2～6 min，取食的间隔时间倾向于15 min的倍数，提出蝗虫若虫在取食量、血淋巴渗透压、嗉囊排空速度和心侧体之间可能存在一定的诱导调节关系，使得蝗虫若虫发育过程中摄食及消化呈现有规律的周期性的变化[2～5]。棉铃虫幼虫则把更多的时间花在取食上，由于其前肠较短，不存在类似蝗虫嗉囊的结构，在消化吸收前不能贮存食物，因而在取食行为上表现为不断取食方式。

Lenz和Teo等发现不同种类昆虫类胰蛋白酶和类胰凝乳蛋白酶在中肠不同部位的活性有差异[9,10]。本研究的结果则表明，几种蛋白酶活性变化在时间上亦并非完全同步，类胰蛋白酶、类胰凝乳蛋白酶、总蛋白酶的活性变化存在时间差异。昆虫如何调节中肠蛋白酶活性，使它们在时间及空间上有规律地变化，以协调统一地发挥作用具有重要的研究价值，尚待进一步探讨。

另外，做昆虫取食及中肠蛋白酶方面的研究，选择生理状态一致的昆虫很关键，本研究为进一步开展这方面的工作在选材上提供了依据。值得指出的是，上述结果是由取食嫩粒豌豆的棉铃虫幼虫得出的。昆虫取食不同食料，其发育和生理状态可能会有一定差异，这一点在有关的具体研究中要考虑在内。

致谢 项秀芬提供虫源并参加部分工作，深表感谢。

参 考 文 献 （References）

1 Marana S R，Ribeiro A F，Terra W R *et al*. Ultrastruture and secretory activity of *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) midguts. J. Insect Physiol.，1997，43（5）：465～473

2 Simpson S J. An oscillation underlying feeding and a number of other behaviours in fifth-instar *Locusta migratoria* nymphs. Physiol. Entomol.，1981，6：315～324

3 Simpson S J. Changes during the 5th instar of *Locusta migratoria* in the rate of crop emptying and their relationship to feeding and food utilization. Entomol. Exp. Appl.，1983，33：235～243

4 Bernays E A，Simpson S J. Control of food intake. Adv. Insect Physiol.，1982，16：59～118

5 Chapman R F. Variations in the size of the midgut caeca during the fifth instar of the grasshopper *Schistocerca americana* (Drury). J. Insect. Physiol.，1988，34：329～335

6 Bot J. Rearing *Heliothis armigera* Hübn. and *Prodenia litura* F. on an artificial diet. S. Afr. J. Agri. Sci.，1966，9：538～539

7 王琛柱，钦俊德. 棉铃虫幼虫中肠主要蛋白酶活性的鉴定. 昆虫学报，1996，39（1）：7～13

8 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem.，1976，72：248～254

9 Lenz C J，Kang J，Rice W C *et al*. Digestive proteinases of larvae of the corn earworm *Heliothis zea*：Characterization，distribution，dietary relationship. Arch. Insect. Biochem. Physiol.，1991，16（3）：201～212

10 Teo L H. Tryptic and chymotryptic activities in different parts of the gut of the field cricket *Gryllus bimaculatus*（Orthoptera：Gryllidae）. Ann. Entomol. Soc. Amer.，1997，90（1）：69～74

CHANGES OF FEEDING BEHAVIOR AND MIDGUT PROTEASE ACTIVITIES OF LARVAL *HELICOVERPA ARMIGERA* DURING THE FOURTH INSTAR

Li Wei　　Wang Chenzhu

（Institute of Zoology，Chinese Academy of Sciences，State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents，Beijing　100080）

Abstract　Change patterns of feeding and midgut protease activities of larval *Helicoverpa armigera* during the fourth instar were investigated. It was shown that food amount eaten by the larvae and body weight gain of the larvae were low at the beginning and the end of instar and peaked at the middle of the instar. Activities of trypsin-like enzyme，chymotrypsin-like enzyme and total proteolysis showed concurrent change patterns with the feeding amount during the 4th instar. Larval ingestion exhibited continuous-feeding pattern，and feeding actions took about one sixth of the total time.

Key words　*Helicoverpa armigera*，feeding behavior，protease